

ゲノム情報に基づいたダイズ根粒菌の芳香族化合物分解系の解明

著者	伊藤 尚文
号	4
学位授与番号	84
URL	http://hdl.handle.net/10097/36948

	い　　とう　　なお　　ふみ
氏名（本籍地）	伊　藤　尚　文
学　位　の　種　類	博士（生命科学）
学　位　記　番　号	生博第84号
学位授与年月日	平成19年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研　究　科　，　専　攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論　文　題　目	ゲノム情報に基づいたダイズ根粒菌の芳香族化合物分解系の 解明
博士論文審査委員	（主査）教　授　南　澤　　　究 教　授　津　田　雅　孝 助教授　日出間　　　純

論文内容の要旨

根粒菌は宿主植物に根粒を形成し共生窒素固定を行う土壌細菌である。ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* が属する *Bradyrhizobiaceae* 科には光合成細菌、農薬・芳香族化合物分解細菌、亜硝酸酸化細菌など多様な性質を持つ環境細菌が見いだされている。*B. japonicum* USDA110 株のゲノムは、ゲノムシーケンス解読が完了している細菌としては3番目の大きさで、 α -Proteobacteria としては最大の 9.1 Mb の環状レプリコン1本で構成されており、共生窒素固定遺伝子は外来性の共生アイランド(0.6 Mb)上に存在している。他の細菌ゲノムと比較して、USDA110株ゲノムには、極めて多数の分解遺伝子・ABCトランスポーター・呼吸鎖・転写因子の多重遺伝子コピーが存在し、それらの機能や意義については不明である。

本研究では、土壌中に豊富に存在する難分解性高分子化合物リグニンの構成単位である芳香族化合物の分解代謝および分解遺伝子に着目し、*B. japonicum* USDA110 株のゲノムの複雑性と生態機能の解明を試みた。*B. japonicum* USDA110 株は、寒天培地上で芳香族化合物に依存した増殖や混合栄養条件での芳香族化合物分解については報告されている。しかし、最小液体培地における芳香族化合物を唯一の基質とした増殖は解析されておらず、芳香族化合物の濃度依存的な増殖、分解代謝経路、分解遺伝子の発現調節機構も明らかにされていない。そこで、本研究では、*B. japonicum* USDA110 の芳香族化合物の資化における至適濃度の検討、ゲノムデータベース解析による代謝経路の推定、アレイ解析による網羅的な発現解析、分解遺伝子欠失株の解析によって、芳香族化合物の分解代謝経路、分解遺伝子、応答機構の解明を行った。

第一章では、種々の芳香族化合物の資化能と増殖に至適な濃度の検討を行った。最初に、最小液体培地(DM培地)に4-Hydroxybenzoate、Protocatechuate、Benzoate、Catechol、Homoprotocatechuate、Homogentisate、Vanillin、Vanillate、Ferulateを添加し、増殖の測定を行った。その結果、DM培地の着色や沈殿の生成がなく、唯一の炭素源として増殖

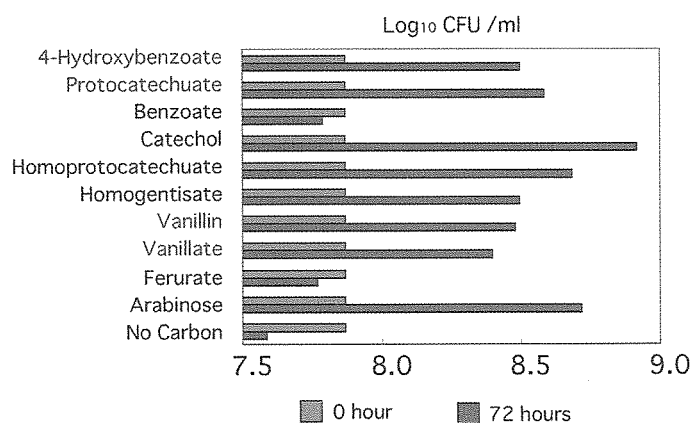


図1. 1 mM の芳香族化合物を添加したDM培地で培養した際の*B. japonicum* USDA110のCFUの測定。HM培地で前培養しDM培地で洗浄した*B. japonicum* USDA110の細胞を、各培地に接種し、30°Cで72時間培養し、CFUを測定した。解析に用いた主要な化合物については赤で示した。

可能な濃度として1 mMの芳香族化合物添加が最適であった。濁度(増殖)測定を行う A_{660} の吸収がなく、細胞の濁度の増加、全菌数、生菌数(CFU, Colony Forming Unit)の増加が見られた化合物は Vanillin、Vanillate、4-Hydroxybenzoate、Protocatechuateの4種であった(図1)。そこで、以後の実験にはこれら4種の芳香族化合物

を用いることとした。

第二章では、ゲノムデータベース (KEGG: (<http://www.genome.jp/kegg/>)、Rhizobase: (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>)、MBGD: (<http://mbgd.genome.ad.jp/>))を用い、*B. japonicum* USDA110 の Vanillin、Vanillate、4-Hydroxybenzoate、Protocatechuete の代謝経路の予測を行った。その結果、各化合物に対応した Oxygenase による酸化分解経路に関わる遺伝子が見いだされ、Vanillin、Vanillate、4-Hydroxybenzoate は Protocatechuete に代謝された後に、

β -Ketoadipate 経路によって TCA cycle で代謝利用されることが推定された。また、3種の Oxygenase 遺伝子はゲノム上でホモログが複数あり、代謝遺伝子群と逆向きに転写調節遺伝子がセットになった、クラスター構造が見いだされた。*B. japonicum* USDA110 株で検出されたクラスターは芳香化合物分解研究が進んでいる *Acinetobacter baylyi* ADP1 株、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株、*Agrobacterium tumefaciens* C58 株、*Sinorhizobium meliloti* 1021 株のクラスターと比較して、ゲノム上に分散して存在している特徴的な構造であった(図2)。

第三章では、*B. japonicum* USDA110 の Vanillin、Vanillate、

4-Hydroxybenzoate、Protocatechuete を唯一の炭素源とした培養細胞を用いて、マクロアレイ法による網羅的な発現解析を行った。第二章で予想した代謝経路の遺伝子は、 β -Ketoadipate 経路の上流の遺伝子は各芳香族化合物に対応した発現の上昇が見られた。一方、 β -Ketoadipate 経路の遺伝子は低レベルで構成的に発現していた。発現誘導がみられた遺伝子は、複数ある遺伝子クラスターのうち、一つだけであった。このように芳香族化合物により β -Ketoadipate 経路の上流のみが発現誘導されるパターンは、既知の *A. baylyi* ADP1 株、*P. aeruginosa* PAO1 株、*A. tumefaciens* C58 株や *S. meliloti* 1021 株と異なり、*B. japonicum* USDA110 特有の発現パターンであり(図2)、

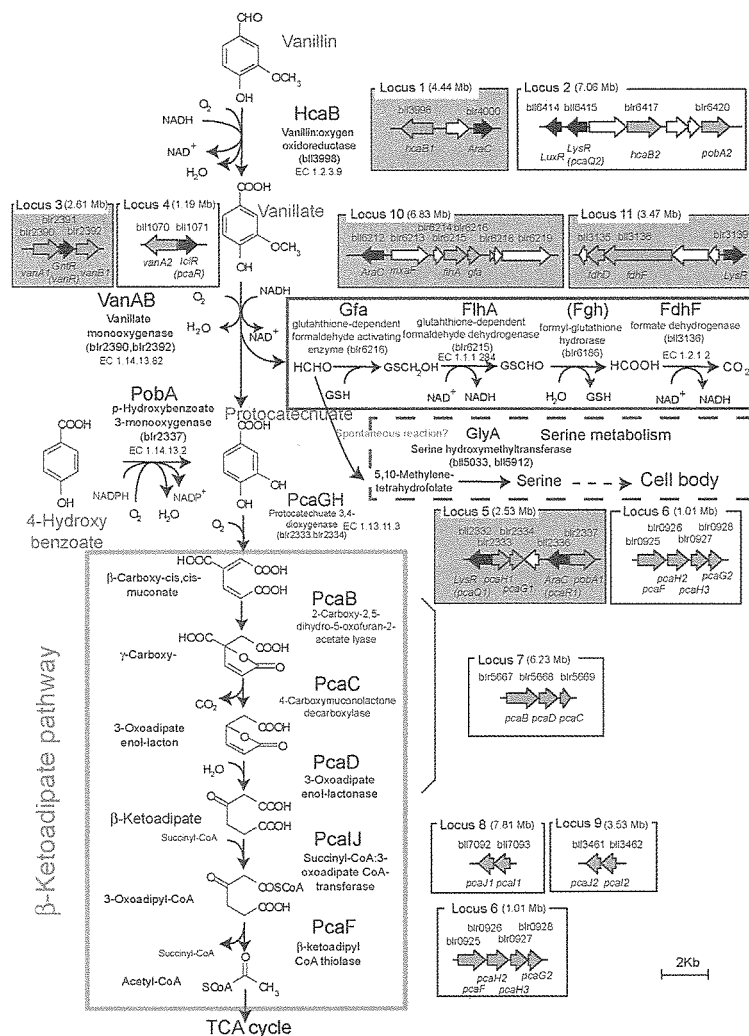


図2 予測された機能遺伝子と代謝経路 *B. japonicum* USDA110基質として使用した芳香族化合物名は緑で示した。複数存在するクラスター構造で、アレイおよびReal-time RT-PCR解析で発現が上昇したクラスターを黒線で表示した。また、Vanillin、Vanillateを添加した*B. japonicum* USDA110細胞でのみ発現誘導がみられた Formaldehyde異化代謝経路は赤い実線で、Formaldehyde同化代謝経路は赤い点線で示した。

発現誘導に必要なエネルギーコストの削減機構とも考えられる。また、Vanillin、Vanillate を添加した際に共通して、Formaldehyde 異化代謝経路の遺伝子の発現上昇がみられた。この経路は Vanillate 分解によって生じる毒性のあるホルムアルデヒドを異化代謝経路の発現上昇によって過剰に蓄積するのを防ぐ解毒的な役割がある経路と考察した(図2)。他にも Protocatechuate 3,4-dioxygenase 活性に必要な鉄の取り込みに関与する遺伝子の発現上昇、過剰なホルムアルデヒドの生成を押さえる機構と考えられた芳香族取り込みチャネルの発現抑制などがみられた。

第四章では Vanillin、Vanillate によって発現の上昇がみられた Vanillate monooxygenase をコードする *vanA1B* 欠失変異株 BJI01 と、ホルムアルデヒド異化代謝経路の formaldehyde dehydrogenase をコードする *fdhF* の欠失変異株 BJI06 を作出し、増殖と基質資化能を解析した。野生株と比較して、*vanA1B* 欠失変異株は Vanillate 存在下における増殖と Vanillate 資化能を失った。したがって、UDSA110 株の主要な Vanillate 分解能は *vanA1B* が担っていた(図3)。*fdhF* 欠失変異株 BJI06 は Vanillate を炭素源として増殖した場合、Vanillate 分解が見られ、Vanillate

と Succinate を炭素源として供与した場合に、野生株と比較して有意に増殖速度が増加した。これは BJI06 において、ホルムアルデヒドの異化経路の代謝が止まり、生成されたホルムアルデヒドを細胞毒性が表れる濃度になる前に、同化経路で処理されたためと考えた(図4)。Vanillate 分解は 1 mM の Succinate を同時に添加した場合にも野生株で起こるた

め、この濃度では Vanillate 分解系遺伝子のカタボライト抑制は起こらないことが明らかになった。

以上の結果から、(1) *B. japonicum* USDA110 株は芳香族化合物を唯一の炭素源として利用すること、(2) 複数存在する分解遺伝子ホモログのうち一つだけを発現上昇させて芳香族化合物を分解していること、(3) リグニンモノマーの Vanillate の分解によって生じたホルムアルデヒドを速やかに取り除く C1 代謝系の存在が明らかとなった。さらに、分解代謝に伴う取り込みや排出系の遺伝子発現機構の存在も示唆された。

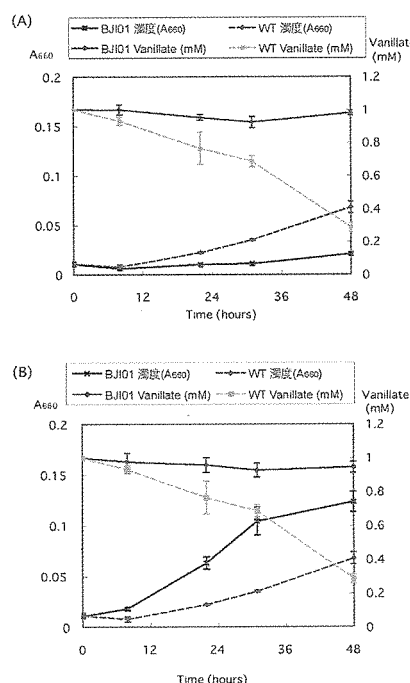


図3 BJI01 (*vanA1B::Q*) と *B. japonicum* USDA110 (WT) の Vanillate 資化能試験。BJI01 を (A) は DM 培地に炭素源として Vanillate 1 mM のみ添加、(B) は DM 培地に炭素源として Vanillate 1 mM と Succinate 1 mM を添加し、30℃ で 48 時間培養した。実験は 3 回で行い、平均値を示した。

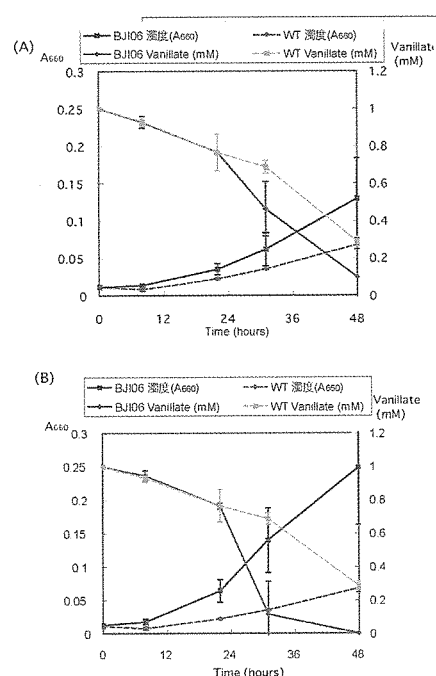


図4 BJI06 (*fdhF::Q*) と *B. japonicum* USDA110 (WT) の Vanillate 資化能試験。BJI06 を (A) は DM 培地に炭素源として Vanillate 1 mM のみ添加、(B) は DM 培地に炭素源として Vanillate 1 mM と Succinate 1 mM を添加し、30℃ で 48 時間培養した。実験は 3 回で行い、平均値を示した。

論文審査結果の要旨

根粒菌は宿主植物に根粒を形成し共生窒素固定を行う土壌細菌である。ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株は、低栄養細菌であり土壌環境に適応する何らかの仕組みを持っていると想定される。*B. japonicum* USDA110 株のゲノムサイズは 9.1 Mb と大きく、多数の分解遺伝子・ABC トランスポーター・呼吸鎖・転写因子の多重遺伝子コピーが存在するが、それらの機能や意義については不明である。本論文では、土壌に存在する芳香族化合物の分解系を担う分解遺伝子に着目し、*B. japonicum* USDA110 株ゲノムの複雑性と土壌環境における機能の関係を明らかにすることを目的とした。

具体的には、*B. japonicum* USDA110 株が唯一の炭素源として最小培地で増殖可能な Vanillin、Vanillate、4-Hydroxybenzoate、Protocatechuate の 4 種の芳香族化合物を対象として、ゲノムデータベースに基づいた分解経路およびエネルギー獲得経路の推定、網羅的な遺伝子発現解析、遺伝子破壊株による機能解析を行った。

その結果、(1)多重化した分解遺伝子ホモログの一部のみが当該芳香族化合物の分解を担っていること、(2)分解の下流に位置する中心代謝系遺伝子は基質で誘導されずに低いレベルで恒常的に発現していること、(3) methoxy 基を有する芳香族化合物の代謝には methanol 酸化系が動員されている可能性を明らかにした。以上の結果は、土壌低栄養細菌である *B. japonicum* は、既知の芳香族分解菌とは異なる分解遺伝子発現ネットワークを保有しており、その特性を明らかにしたものとして評価できる。さらに、methoxy 基を有する芳香族化合物 Vanillin、Vanillate の分解への C1 代謝の関与については、新規性の高い発見であり、本論文でもその重要性が十分議論されている。これらの知見は微生物生態学、微生物生理学、ゲノム微生物学の観点からも大変興味深いものである。

以上の論文内容は、伊藤尚文君が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。そこで、審査員一同、伊藤尚文提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認めた。